

**LIANA ALVES DE OLIVEIRA**

**Microsatélites do Complexo Principal de Histocompatibilidade  
(MHC) em uma população brasileira**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Luiza Petzl-Erler

CURITIBA

2004

## AGRADECIMENTOS

À professora Luiza, pela orientação, pelos ensinamentos e pela compreensão nestes quase dois anos e meio de trabalho.

Aos professores Emanuel e Fábio Pedrosa, do Departamento de Bioquímica, por permitir que eu utilizasse o espaço e os equipamentos por um período tão longo, mesmo com a grande demanda do Departamento.

Ao Valter, pela iniciativa, pelo apoio e pela amizade neste tempo em que trabalhamos juntos.

À Noemi, pelo esforço e dedicação para que tudo desse sempre tão certo.

Aos professores do Departamento de Genética, em especial ao professor e chefe Karam e aos membros da banca, Maria da Graça e Ricardo, pela convivência amigável e pelos ensinamentos nestes dois anos.

Às minhas queridas amigas Valéria e Anilda, pela força e apoio nos momentos difíceis, pela companhia e pelas festas.

Ao pessoal do Laboratório, em especial Marcinha, Karen, KB e Dani, pela ajuda, pelo incentivo e pela companhia.

Aos meus eternos amigos Fátima, Marja, Manu, Jú Laufer, Jú Baladelli, Laila e Polly, pela companhia, pelas risadas, pelas broncas quando eu trabalhava demais e por vocês existirem. Adoro Vocês!

À minha família que sempre me apoiou e sempre se esforçou para tentar, em vão, entender meu trabalho. Amo vocês!

Ao meu amado namorado, Terror, que, além do apoio, do carinho, dos cafunés e beijinhos e da paciência, me ajudou muito. Te amo!

## SUMARIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>v</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 APLICAÇÕES DO ESTUDO DE GENES E MARCADORES GENÉTICOS EM POPULAÇÕES.....	1
1.1.1 A população deste estudo.....	2
1.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....	2
1.3 MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	4
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
3.1 AMOSTRA DE DNA.....	10
3.2 ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES.....	11
3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	14
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> População brasileira de acordo com o último censo (2000).....	3
<b>Tabela 2.</b> Unidades de repetição dos microssatélites e alguns estudos já feitos com os mesmos.....	6
<b>Tabela 3.</b> Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos fragmentos resultantes da PCR e cores de marcação fluorescente para cada microssatélite.....	12
<b>Tabela 4.</b> Quantidade de cada oligonucleotídeo iniciador colocada por amostra por reação de PCR (volume final de 20 µl).....	13
<b>Tabela 5.</b> Frequências alélicas absolutas e relativas do microssatélite <i>TNFD</i> e valor de <i>P</i> encontrado na comparação das duas amostras populacionais.....	16
<b>Tabela 6.</b> Frequências alélicas absolutas e relativas do microssatélite <i>D6S2222</i> e valor de <i>P</i> encontrado na comparação das duas amostras populacionais.....	17
<b>Tabela 7.</b> Frequências alélicas absolutas e relativas do microssatélite <i>MICA</i> e valor de <i>P</i> encontrado na comparação das duas amostras populacionais.....	19
<b>Tabela 8.</b> Frequências alélicas absolutas e relativas do microssatélite <i>HLAC-CA1</i> e valor de <i>P</i> encontrado na comparação das duas amostras populacionais.....	20
<b>Tabela 9.</b> Frequências alélicas absolutas e relativas do microssatélite <i>BAT2CA</i> e valor de <i>P</i> encontrado na comparação das duas amostras populacionais.....	21
<b>Tabela 10.</b> Frequências alélicas absolutas e relativas do microssatélite <i>D6S510</i> e valor de <i>P</i> encontrado na comparação das duas amostras populacionais.....	22
<b>Tabela 11.</b> Frequências alélicas absolutas e relativas do microssatélite <i>M2_5_11</i> e valor de <i>P</i> encontrado na comparação das duas amostras populacionais.....	24
<b>Tabela 12.</b> Frequências alélicas absolutas e relativas do microssatélite <i>DRACA1</i> e valor de <i>P</i> encontrado na comparação das duas amostras populacionais.....	25
<b>Tabela 13.</b> Número de haplótipos encontrados e número de haplótipos esperados em total aleatoriedade.....	26
<b>Tabela 14.</b> Frequências alélicas do microssatélite <i>MICA</i> em diversas populações.....	31
<b>Tabela 15.</b> Frequências de indivíduos portadores das variantes do microssatélite <i>TNFD</i> .....	33
<b>Tabela 16.</b> Heterozigosidades observadas nos dois estratos populacionais estudados.....	35

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Posição dos microssatélites no MHC. Em azul estão os microssatélites que fazem parte do trabalho.....5
- Figura 2.** Mapa do Brasil. Em vermelho, região Sul. Em amarelo, região Sudeste. Em azul, região Centro-Oeste. Em laranja, região Nordeste. Em verde, região Norte.....10

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 APLICAÇÕES DO ESTUDO DE GENES E MARCADORES GENÉTICOS EM POPULAÇÕES

O estudo de genes em populações é muito importante e vem sendo empregado para diversas finalidades. É possível, por exemplo, reconstruir a evolução humana através de estudos genéticos com as populações existentes hoje. Para tal, devemos colher o máximo de informações sobre o maior número possível de genes (CAVALLI-SFORZA, 2003).

É importante também caracterizar populações quanto aos genes de proteínas do sistema imune, pois estes podem estar participando da patogênese de certas doenças. Um alelo que confira susceptibilidade a uma doença pode ser raro em uma população e comum em outra, tendo diferente impacto em cada uma delas. Assim, as frequências alélicas conhecidas podem servir de referência para estudos de associação com doenças na população em questão e podem ajudar a compreender a susceptibilidade/resistência nela encontradas (PETZL-ERLER, 1999). Diversos estudos deste tipo, com genes do sistema imune em populações, já foram realizados, como, por exemplo, genes de citocinas na população coreana (PYO *et al.*, 2003b), genes de MHC classe III em Kaingang e Guarani (WEG-REMERS *et al.*, 1997) e genes de MHC classe II em Ameríndios (TSUNETO *et al.*, 2003).

Marcadores genéticos são sequências polimórficas do genoma, que podem estar em regiões intergênicas ou fazerem parte de genes. Apesar de não serem sempre traduzidos em proteínas, ou transcritos em RNA funcionais, eles podem fornecer informações similares a respeito da evolução humana e de diversidade intra e inter populacional. Além disso, podem servir como ferramenta para o rastreamento de genes associados a doenças, desde que estejam em desequilíbrio de ligação com as variantes de susceptibilidade ou resistência.

### 1.1.1 A população deste estudo

A população brasileira é uma população altamente miscigenada, já que deriva da imigração de europeus e africanos e de populações indígenas. Tem uma composição própria, diferente das populações de origem. Além disso, a contribuição de cada população ancestral varia de acordo com a região do país (Tabela 1), sendo importante caracterizar a população estudada quanto à origem étnica e à localização, pois diferentes frequências de certas variantes genéticas podem ser entendidas de acordo com a história da população estudada.

A população analisada neste estudo provém basicamente das regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. A amostra é formada por indivíduos de origem predominantemente européia e indivíduos mestiços, de origem européia e africana.

## 1.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (ou MHC, do inglês Major Histocompatibility Complex) é uma região cromossômica que, em humanos, possui 4Mb e mais de 200 genes conhecidos. Está localizado no cromossomo 6 (6p21.31) e cerca de 40% de seus genes codificam proteínas envolvidas na resposta imune (The MHC Sequencing Consortium, 1999).

Dentre estes genes estão os das moléculas MHC clássicas, responsáveis pela apresentação de antígenos às células T. Estas moléculas recebem, em humanos, o nome de HLA e existem em duas classes: I e II. Seus genes são os genes humanos com maior grau de polimorfismo, sendo que para classe I o gene mais polimórfico é o HLA-B, com 563 alelos conhecidos, e para classe II é o HLA-DRB1, com 447 alelos (IMGT/HLA Sequence Database). Porém, a maior parte destes alelos é muito rara e alguns são exclusivos de certas populações. Um estudo de genes HLA de classe I com uma população brasileira encontrou 74 alelos de HLA-B (BRAUN-PRADO *et al.*, 2000). Populações isoladas (como ameríndios) têm um número ainda menor de alelos. Então, estes genes podem contribuir para estudos da história demográfica das populações e seu grau de miscigenação (JANEWAY e TRAVERS, 1997; MEYER e THOMSON, 2001).

**Tabela 1.** População brasileira de acordo com o último censo (2000).

Região	População residente por cor ou raça						TOTAL
	Branca (%)*	Preta (%)*	Amarela (%)*	Parda (%)*	Indígena (%)*	Sem declaração (%)*	
Sul	20 991 862 (83,59%)	941 222 (3,74%)	104 239 (0,40%)	2 884 741 (11,48%)	84 747 (0,33%)	103 538 (0,4%)	25 110 348
Sudeste	45 163 258 (62,35%)	4 752 920 (6,56%)	514 562 (0,70%)	21 367 768 (29,50%)	161 189 (0,20%)	470 496 (0,60%)	72 430 193
Centro- oeste	5 787 384 (49,72%)	537 870 (4,62%)	46 294 (0,40%)	5 083 964 (43,68%)	104 360 (0,80%)	78 786 (0,60%)	11 638 658
Nordeste	15 738 697 (32,93%)	3 681 117 (7,70%)	67 241 (0,10%)	27 722 133 (58,01%)	170 389 (0,30%)	402 909 (0,80%)	47 782 487
Norte	3 616 839 (28,01%)	641 208 (4,96%)	29 246 (0,22%)	8 259 486 (63,97%)	213 443 (1,65%)	150 947 (1,17%)	12 911 170
TOTAL	91 298 040	10 554 337	761 582	65 318 092	734 128	1 206 676	169 872 856

\*Porcentagem da cor ou raça por região.



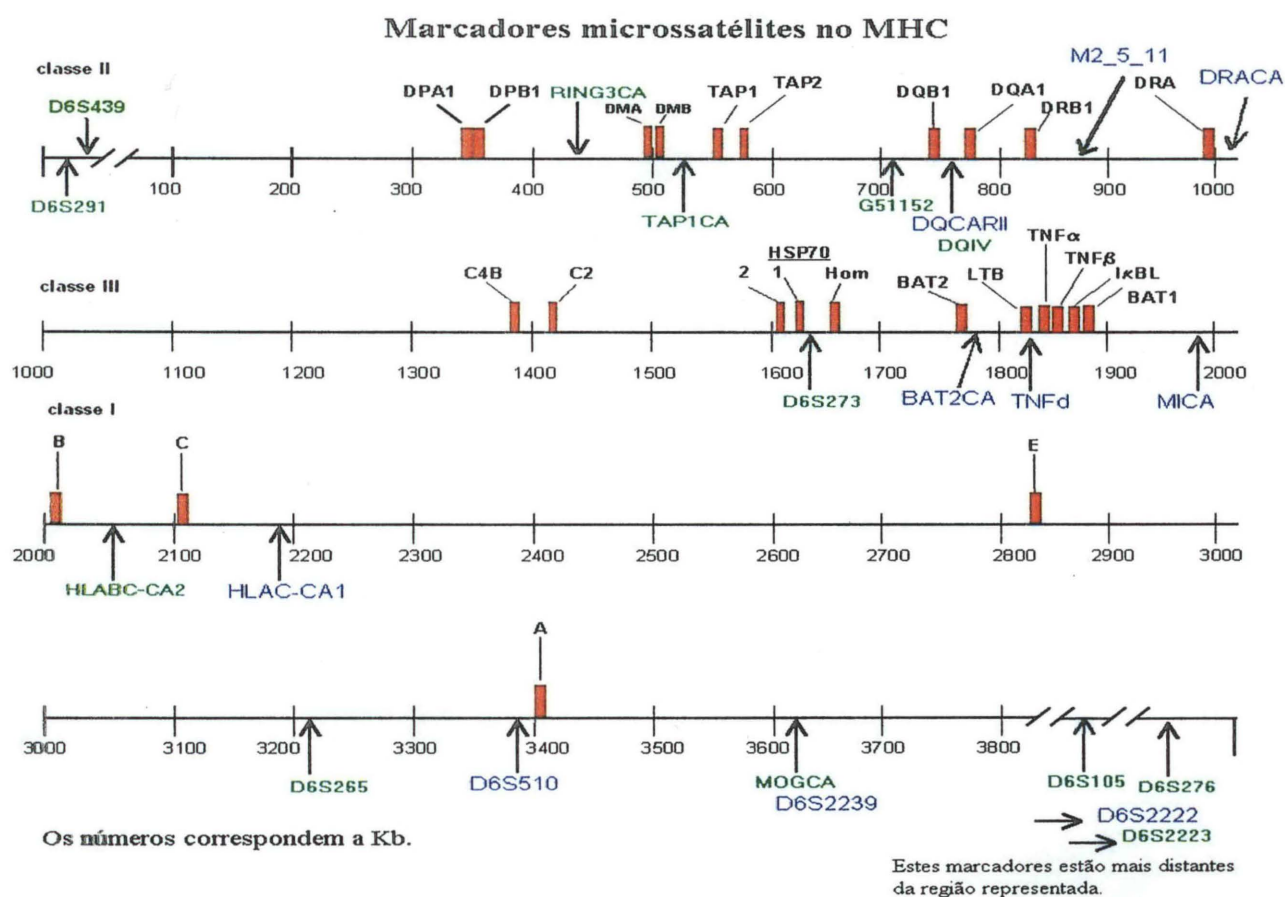
### 1.3 MARCADORES MICROSSATÉLITES

No genoma humano existem várias seqüências de DNA repetitivo. Dentre eles, estão os VNTR (repetições em *tandem* de número variável), que são separados em classes de acordo com seu tamanho: minissatélites e microssatélites. Os microssatélites possuem repetições de 1 a 6 pb, ou seja, uma seqüência de 1 a 6 pb se repete em *tandem* por diversas vezes. São abundantes em todo o genoma, possuem alto polimorfismo e seguem o padrão mendeliano de herança, o que os torna bons marcadores genéticos. Por isso, são muito utilizados como ferramenta para estudos de mapeamento genético, análise de ligação, estudos evolutivos e medicina forense (FOISSAC *et al.*, 1997).

Os microssatélites possuem uma elevada taxa de mutação, que varia entre  $10^{-3}$  e  $10^{-6}$  por loco por evento meiótico. Estas mutações ocorrem freqüentemente durante a meiose, na qual pode-se ganhar ou perder repetições, geralmente apenas uma repetição por vez. Então, cada alelo de um microssatélite se refere ao número de repetições encontradas (FOISSAC *et al.*, 1997; CAVALLI-SFORZA, 2003).

Já foram descritos mais de 50 microssatélites na região do MHC ou em seu entorno, sendo um a cada 10 Kb. Nesta região predominam os microssatélites dinucleotídeos (CA)<sub>n</sub>, que são encontrados a cada 30 a 60 Kb. A importância destes marcadores está relacionada à sua localização. Já foi descrito desequilíbrio de ligação entre vários genes do MHC e microssatélites, como, por exemplo, alelos HLA de classe I e *D6S105* e *D6S265* em haplótipos europeus (FOISSAC *et al.*, 1997).

Portanto, microssatélites do MHC são muito informativos no estudo de genética de populações e já são muito usados para definir grupos, reconstruir migrações e investigar a estrutura genética de populações. Além disso, também são importantes e muito utilizados na procura de genes de susceptibilidade a doenças, como, por exemplo, diabetes mellitus, esclerose múltipla (FOISSAC *et al.*, 1997) e pênfigo foliáceo endêmico (resultados não publicados do Laboratório de Genética Molecular Humana, UFPR). Para este estudo, foram selecionados os seguintes microssatélites: *D6S510*, *D6S2222*, *M2\_5\_11*, *HLAC-CA1*, *DRAC1*, *DQCARI*, *TNFD*, *MICA*, *BAT2CA* e *D6S2239*, dos quais a localização é mostrada na Figura 1.



**Figura 1.** Posição dos microssatélites no MHC. Em azul estão os microssatélites que fazem parte do trabalho.

Estes microssatélites são, na sua maioria, dinucleotídeos, mas a unidade de repetição varia (Tabela 2). A grande parte dos estudos feitos com estes microssatélites são de associação com doenças complexas, sendo que estudos populacionais são mais raros (Tabela 2).

**Tabela 2.** Unidades de repetição dos microssatélites e alguns estudos já feitos com os mesmos.

continua

Marcador microssatélite	Unidade de repetição	Alguns estudos
<i>MICA</i>	GCT	Nove grupos populacionais (OTA <i>et al.</i> , 1997); doença de Behcet (MIZUKI <i>et al.</i> , 1997; WALLACE <i>et al.</i> , 1999; YABUKI <i>et al.</i> , 1999; PARK <i>et al.</i> , 2002a); neoplasia cervical intraepitelial (GHADERI <i>et al.</i> , 1999); câncer de colo de útero (GHADERI <i>et al.</i> , 2001); diabetes do tipo 1 (PARK <i>et al.</i> , 2001); doença de Addison (PARK <i>et al.</i> , 2002b); azospermia não obstrutiva (TSUJIMURA <i>et al.</i> , 2002); população coreana (PYO <i>et al.</i> , 2003a); artrite reumatóide (MOK <i>et al.</i> , 2003); doença mista do tecido conectivo (HASSAN <i>et al.</i> , 2003); estudo de uma população chinesa (FENG <i>et al.</i> , 2004); resposta a transplante (LI <i>et al.</i> , 2004); artrite psoriática (GRUBIC <i>et al.</i> , 2004)
<i>DQCARI</i>	CA	Estudo de três grupos étnicos (LIN <i>et al.</i> , 1997); narcolepsia (MIGNOT <i>et al.</i> , 1997); diabetes mellitus (YU <i>et al.</i> , 1999); população finlandesa (KARELL <i>et al.</i> , 2000); azospermia não obstrutiva (TSUJIMURA <i>et al.</i> , 2002); pênfigo vulgar (SLOMOV <i>et al.</i> , 2003); artrite reumatóide (YU <i>et al.</i> , 2003); resposta a transplante (LI <i>et al.</i> , 2004)
<i>D6S2222</i>	dinucleotídeo	Hemocromatose (THOMAS <i>et al.</i> , 1998); artrite reumatóide (YU <i>et al.</i> , 2003)

**Tabela 2.** Unidades de repetição dos microssatélites e alguns estudos já feitos com os mesmos.

continuação		
Marcador microssatélite	Unidade de repetição	Alguns estudos
<i>TNFd</i>	GA	Esclerose múltipla (KIRK <i>et al.</i> , 1997; RUBIO <i>et al.</i> , 2002); artrite juvenil (FEICHTLBAUER <i>et al.</i> , 1998); população coreana (KIM <i>et al.</i> , 2000); doença linfoproliferativa (MAINOU-FOWLER <i>et al.</i> , 2000); azospermia não obstrutiva (TSUJIMURA <i>et al.</i> , 2002); artrite reumatóide (YU <i>et al.</i> , 2003); nefropatia IgA (TUGLULAR <i>et al.</i> , 2003); resposta a transplante (CAVET <i>et al.</i> , 1999; LI <i>et al.</i> , 2004); resposta ao tratamento de artrite reumatóide (MARTINEZ <i>et al.</i> , 2004)
<i>BAT2CA</i>	CA	Pênfigo vulgar (SLOMOV <i>et al.</i> , 2003); resposta ao tratamento de artrite reumatóide (MARTINEZ <i>et al.</i> , 2004)
<i>D6S2239</i>	dinucleotídeo	Hemocromatose (AJIOKA <i>et al.</i> , 1997; THOMAS <i>et al.</i> , 1998; PRATIWI <i>et al.</i> , 1999)
<i>M2_5_11</i>	TTCTT	Apenas a descrição (MATSUZAKA <i>et al.</i> , 2000)

**Tabela 2.** Unidades de repetição dos microssatélites e alguns estudos já feitos com os mesmos.

conclusão		
Marcador microssatélite	Unidade de repetição	Alguns estudos
<i>D6S510</i>	(CA) <sub>n</sub> CG(CA) <sub>n</sub> (GA) <sub>n</sub>	Artrite juvenil (FEICHTLBAUER <i>et al.</i> , 1998); hemocromatose (GANDON <i>et al.</i> , 1996); pênfigo vulgar (SLOMOV <i>et al.</i> , 2003); estudo de resposta a transplante (LI <i>et al.</i> , 2004)
<i>HLAC-CA1</i>	CA	Pênfigo vulgar (SLOMOV <i>et al.</i> , 2003)
<i>DRACA1</i>	CA	Não foram localizadas informações.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar uma população brasileira formada por indivíduos de origem predominantemente européia e indivíduos mestiços quanto aos seguintes microssatélites do Complexo Principal de Histocompatibilidade: *D6S510*, *D6S2222*, *M2\_5\_11*, *HLA-C\*01*, *DRACA1*, *DQCARI*, *TNF $\alpha$* , *MICA*, *BAT2CA* e *D6S2239*.

Os objetivos específicos são:

- ◆ Realizar a tipagem dos microssatélites citados acima na amostra da população brasileira;
- ◆ Calcular as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas para os microssatélites na população;
- ◆ Verificar se há diferença entre as frequências encontradas no extrato populacional formado por indivíduos de origem predominantemente européia e o extrato de indivíduos mestiços;
- ◆ Verificar se as frequências genotípicas dos locos estudados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRA DE DNA

Os indivíduos deste estudo provêm principalmente das regiões centro-oeste ( $n=68$ ) e sudeste ( $n=74$ ) do Brasil (Figura 2), mas também há indivíduos da região sul ( $n=39$ ), nordeste ( $n=24$ ) e norte ( $n=1$ ). A amostra é formada por 141 indivíduos de origem predominantemente européia (E) e 65 indivíduos mestiços (M), de origem européia e africana.

A extração de DNA foi realizada pelos métodos de salting-out (LAHIRI e NURNBERGER, 1991) e de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (13° IHWC, 2000).



**Figura 2.** Mapa do Brasil. Em vermelho, região Sul. Em amarelo, região Sudeste. Em azul, região Centro-Oeste. Em laranja, região Nordeste. Em verde, região Norte.

### 3.2 ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES

A tipagem dos microssatélites foi feita com base em um método semi-automatizado, no qual foram amplificadas as regiões de microssatélites selecionadas por PCR com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) marcados com fluorescência. Os segmentos amplificados foram submetidos à corrida eletroforética no aparelho sequenciador ABI Prism 377, na qual foram separados por tamanho. Os alelos foram designados com o uso dos programas computacionais Genescan 2.1 e Genotyper 2.0.

A marcação fluorescente dos *primers* foi escolhida de maneira que permitisse que produtos amplificados de diferentes locos com sobreposição de tamanho pudessem ser aplicados juntos para corrida eletroforética. A cor de marcação dos *primers* e os tamanhos de fragmentos gerados na PCR estão na Tabela 3.

A amplificação foi feita com reações multiplex para cada amostra, formando-se os seguintes grupos de microssatélites:

GRUPO I: *DQCARI*, *TNFd*, *MICA* e *D6S2222*;

GRUPO IIa: *DRACA1*, *BAT2CA* e *M2\_5\_11*;

GRUPO IIb: *D6S2239*, *HLAC-CA1* e *D6S510*;

Sendo que IIa e IIb foram aplicados juntos na corrida eletroforética.

As condições para a amplificação foram as seguintes: 2 a 16 pmoles de primer (Tabela 4); 2 µl de Tampão 10X; dNTP 0,25 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,5 U de Taq polimerase *Platinum*; e 5 µl de DNA (20 µg/ml), para um volume final de 20 µl. A PCR é iniciada com uma temperatura de 94°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos; 54,5°C (grupo I), ou 60°C (grupo II) por 30 segundos; e 72°C por 1 minuto. A reação é finalizada com uma temperatura de 72°C por 40 minutos, seguida de 4°C até os produtos serem retirados do aparelho.



**Tabela 3.** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos fragmentos resultantes da PCR e cores de marcação fluorescente para cada microsatélite.

<b>Loco</b> <b>Grupo I</b>	<b>Sequência do <i>primer</i> 5' - 3'</b> <b>(marcação)</b>	<b>Sequência do <i>primer</i></b> <b>3' - 5'</b>	<b>Tamanho dos</b> <b>fragmentos (kb)</b>
<i>DQCARI</i>	5'tgattcataaggcaagaatccagcatattgg (NED - amarelo)	5'gatgatttaagtttctgtggacc	180 - 230
<i>TNFD</i>	5'catagtgggactctgtctccaaag (NED - amarelo)	5'agatccttcctgtgagttctgct	124 - 138
<i>MICA</i>	5'ccttttttcagggaagtgc (VIC - verde)	5'ccttaccatctccagaaactgc	179 - 200
<i>D6S2222</i>	5'agtcattctgaagattgg (6-FAM - azul)	5'gcattgtcttcttgaagg	236 - 252
<b>Loco</b> <b>Grupo II</b>	<b>Sequência do <i>primer</i> 5' - 3'</b> <b>(marcação)</b>	<b>Sequência do <i>primer</i></b> <b>3' - 5'</b>	<b>Tamanho dos</b> <b>fragmentos (kb)</b>
<i>DRACA1</i>	5'tggaatctcatcaaggctcag (NED - amarelo)	5'acatttgatgcttcagatg	240 - 270
<i>D6S2239</i>	5'gttggaagcaatggattagatgcc (NED - amarelo)	5'ctacctgccaggaaca	106 - 118
<i>BAT2CA</i>	5'ctccagcctggataacag (VIC - verde)	5'acaagggttaggaggtct	135 - 165
<i>HLAC-CA1</i>	5'gcctgccaccataccccact (VIC - verde)	5'tagactagctcttgactact	101 - 121
<i>M2_5_11</i>	5'ccagatttctagattaccatcatc (6FAM - azul)	5'tgaaattgcaaccagaatcac	285 - 321
<i>D6S510</i>	5'aatgggtactacttcacacc (6-FAM - azul)	5'caacacactgattccatagc	170 - 202

**Tabela 4.** Quantidade de cada oligonucleotídeo iniciador colocada por amostra por reação de PCR (volume final de 20 µl).

Marcador Microssatélite de GRUPO I	Quantidade de oligonucleotídeo iniciador (pmol)	Marcador Microssatélite de GRUPO II	Quantidade de oligonucleotídeo iniciador (pmol)
<i>DQCARI</i>	8,0	<i>M2_5_11</i>	14,0
<i>TNFD</i>	4,0	<i>DRACA1</i>	16,0
<i>D6S2222</i>	4,0	<i>BAT2CA</i>	10,0
<i>MICA</i>	4,0	<i>HLAC-CA1</i>	10,0
		<i>D6S510</i>	2,0
		<i>D6S2239</i>	8,0

Após a PCR, os produtos foram diluídos em água mili-Q nas seguintes proporções: 2 µl de produto de PCR em 5 µl de água, para grupo I; 2 µl de produto de PCR do grupo IIa e 2 µl de produto de PCR do grupo IIb em 4 µl de água, para o grupo II. Imediatamente antes da aplicação no gel, 1 µl de cada produto diluído foi misturado com 0,21 µl do marcador de tamanho ROX-350; 0,42 µl de corante Blue Dextran e 0,84 µl de formamida deionizada. A mistura era submetida a uma temperatura de 94°C por 5 minutos para que os produtos de PCR fossem desnaturados. Logo em seguida eram aplicados 2 µl desta mistura no gel já polimerizado.

### 3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As frequências alélicas foram obtidas por contagem. As frequências genotípicas foram obtidas também por contagem utilizando o programa Convert (PROBST, 1998). As frequências haplotípicas foram obtidas por máxima verossimilhança, através do algoritmo EM, incluído no pacote de programas Arlequin v. 2.000. (SCHNEIDER *et al.*, 2000). A verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi feita pela comparação da frequência observada dos genótipos com aquela esperada em equilíbrio através do teste de GUO e THOMPSON (1992), utilizando-se também o pacote de programas Arlequin v. 2.000. (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Comparações entre populações foram feitas pelo teste exato de Fisher, com auxílio do programa RXC (MILLER, 1997) sendo adotado como limite de significância  $P=0,05$ .

#### 4 RESULTADOS

Os resultados de frequências alélicas obtidos para cada microssatélite em cada extrato populacional (indivíduos de origem predominantemente européia – E – e indivíduos mestiços de origem européia e africana – M) estão mostrados nas Tabelas 5 a 12. O microssatélite *DQCARI* foi excluído das análises, pois os resultados obtidos não foram confiáveis. Há relatos anteriores que mostram igual dificuldade para a tipagem deste marcador (Marry Carrington, comunicação pessoal). Também não foi incluído o microssatélite *D6S2239*, pois houve problemas na tipagem, totalizando apenas 20 indivíduos com resultados e este número foi considerado insuficiente para a análise.

Para o microssatélite *TNFD* foram encontrados 7 alelos, sendo que o mais freqüente foi o 130 nos dois extratos populacionais, atingindo a metade (em M) ou quase (em E) do total da frequência alélica (Tabela 5). Foi feita também a comparação entre as frequências nos dois extratos populacionais, sendo que houve diferença significativa ( $P=0,03004$ ) apenas para o alelo 128 (Tabela 5). Outro cálculo foi feito levando-se em consideração a distribuição de frequência do conjunto total de alelos. Para este teste também não houve diferença significativa entre os extratos populacionais ( $P=0,17638$ ). A heterozigosidade observada foi de 65,35% em E e 68,42% em M.

Para o microssatélite *D6S2222* foram encontrados 9 alelos, sendo que os mais freqüentes foram o 240 em E e o 242 em M. A soma destes dois alelos atinge 76,5% da frequência total em E e 83% em M (Tabela 6). Na comparação entre os dois extratos populacionais, encontrou-se diferença significativa ( $P=0,0093$ ) para o alelo 244 (Tabela 6) e para a distribuição alélica ( $P=0,02572$ ). A heterozigosidade observada foi de 65,22% em E e 53,57% em M.

**Tabela 5.** Frequências alélicas absolutas e relativas do microssatélite *TNFD* e valor de *P* encontrado na comparação das duas amostras populacionais.

ALELOS (tamanho do fragmento em pares de base)	E (N=126) n (%)	M (N=57) n (%)	<i>P</i>
126	16 (6,3%)	6 (5,3%)	0,812980
128	3 (1,2%)	6 (5,3%)	<b>0,030040</b>
130	119 (47,6%)	57 (50,0%)	0,649380
132	79 (31,1%)	26 (22,8%)	0,109760
134	30 (11,8%)	17(14,9%)	0,503160
136	4 (1,6%)	2 (1,7%)	1,000000
138	1 (0,4%)	0	1,000000

E: amostra de origem predominantemente européia; M: amostra de mestiços de origem européia e africana; n: frequência absoluta do alelo; (%): frequência relativa do alelo; N: número de indivíduos da amostra; *P*: valor de significância.

**Tabela 6.** Frequências alélicas absolutas e relativas do microsatélite *D6S2222* e valor de *P* encontrado na comparação das duas amostras populacionais.

ALELOS (tamanho do fragmento em pares de base)	E (N=115) n (%)	M (N=56) n (%)	<i>P</i>
236	0	1 (0,9%)	0,333800
238	6 (2,6%)	1 (0,9%)	0,429860
240	91 (39,6%)	42 (37,5%)	0,726160
241	4 (1,7%)	2 (1,8%)	1,000000
242	85 (37,0%)	51 (45,5%)	0,145360
244	37 (16,1%)	7 (6,2%)	<b>0,009300</b>
246	2 (0,9%)	2 (1,8%)	0,599480
250	2 (0,9%)	2 (1,8%)	0,254400
252	2 (0,9%)	4 (3,6%)	0,094020

E: amostra de origem predominantemente européia; M: amostra de mestiços de origem européia e africana; n: frequência absoluta do alelo; (%): frequência relativa do alelo; N: número de indivíduos da amostra; *P*: valor de significância.

Para o microssatélite *MICA* foram encontrados 5 alelos, sendo que os mais freqüentes foram o 197 em E e o 188 em M (Tabela 7). A freqüência alélica variou entre os dois extratos populacionais, sendo que foi encontrada diferença significativa na freqüência do alelo 197 ( $P=0,03732$ ), e valores próximos ao limiar de significância ( $P=0,06014$ ) para o alelo 188 (Tabela 7) e para a distribuição alélica ( $P=0,09652$ ). A heterozigosidade observada foi de 70,75% em E e 73,58% em M.

Para o microssatélite *HLAC-CAI* foram encontrados 14 alelos, sendo que o mais freqüente foi o 103 nos dois extratos populacionais (Tabela 8). Não foi encontrada diferença significativa entre as populações para a freqüência de nenhum alelo (Tabela 8) e nem para a distribuição alélica ( $P=0,31208$ ). A heterozigosidade observada foi de 77,60% em E e 84,75% em M.

Para o microssatélite *BAT2CA* foram encontrados 15 alelos, sendo que os mais freqüentes foram o 144 em E e o 142 em M (Tabela 9). Foi encontrada diferença significativa entre as populações para a freqüência dos alelos 146 ( $P=0,0192$ ), 152 ( $P=0,04122$ ) e 158 ( $P=0,03628$ ). Para o alelo 142 o valor de  $P$  ( $P=0,0523$ ) foi muito próximo ao limiar (Tabela 9). Além disso, foi significativa também a diferença encontrada entre a distribuição alélica dos dois extratos populacionais ( $P=0,004177$ ). A heterozigosidade observada foi de 89,08% em E e 84,21% em M.

Para o microssatélite *D6S510* foram encontrados 10 alelos, sendo que o mais freqüente foi o 178, nos dois extratos populacionais (Tabela 10). Foi encontrada diferença significativa entre as populações (Tabela 10) para a freqüência dos alelos 186 ( $P=0,0102$ ), 194 ( $P=0,02658$ ) e na distribuição alélica ( $P=0,007819$ ). A heterozigosidade observada foi de 82,18% em E e 81,39% em M.

**Tabela 7.** Frequências alélicas absolutas e relativas do microsatélite *MICA* e valor de *P* encontrado na comparação das duas amostras populacionais.

ALELOS (tamanho do fragmento em pares de base)	E (N=106) n (%)	M (N=53) N (%)	<i>P</i>
182	17 (8,0%)	5 (4,7%)	0,363120
185	30 (14,1%)	17 (16,0%)	0,729700
186	52 (24,5%)	29 (27,4%)	0,598860
188	46 (21,7%)	72 (32,1%)	0,060140
197	67 (31,6%)	21 (19,8%)	<b>0,037320</b>

E: amostra de origem predominantemente européia; M: amostra de mestiços de origem européia e africana; n: frequência absoluta do alelo; (%): frequência relativa do alelo; N: número de indivíduos da amostra; *P*: valor de significância.



**Tabela 8.** Frequências alélicas absolutas e relativas do microsatélite *HLAC-CAI* e valor de *P* encontrado na comparação das duas amostras populacionais.

ALELOS (tamanho do fragmento em pares de base)	E (N=125) n (%)	M (N=59) n (%)	<i>P</i>
100	0	2 (1,69%)	0,101100
101	1 (0,4%)	0	1,000000
102	1 (0,4%)	0	1,000000
103	79 (31,6%)	40 (33,9%)	0,713800
105	4 (1,6%)	4 (2,5%)	0,684960
106	0	1 (0,8%)	0,319440
107	52 (20,8%)	25 (21,2%)	1,000000
109	31 (12,4%)	16 (13,6%)	0,747860
111	10 (4,0%)	6 (5,1%)	0,598820
113	2 (0,8%)	3 (2,5%)	0,331040
115	13 (5,2%)	2 (1,7%)	0,153120
117	42 (16,8%)	13 (11,0%)	0,167860
119	14 (5,6%)	6 (5,1%)	1,000000
121	1 (0,4%)	1 (0,8%)	0,540200

E: amostra de origem predominantemente européia; M: amostra de mestiços de origem européia e africana; n: frequência absoluta do alelo; (%): frequência relativa do alelo; N: número de indivíduos da amostra; *P*: valor de significância.

**Tabela 9.** Frequências alélicas absolutas e relativas do microssatélite *BAT2CA* e valor de *P* encontrado na comparação das duas amostras populacionais.

ALELOS (tamanho do fragmento em pares de base)	E (N=119) n (%)	M (N=57) n (%)	<i>P</i>
139	0	1 (0,9%)	0,323100
140	18 (7,6%)	9 (7,9%)	1,000000
142	61 (25,6%)	41 (36,0%)	0,052300
144	65 (37,3%)	27 (23,7%)	0,515320
146	8 (3,4%)	11 (9,6%)	<b>0,019200</b>
148	5 (2,1%)	5 (4,4%)	0,306160
149	1 (0,4%)	0	1,000000
150	4 (1,7%)	1 (0,9%)	1,000000
151	1 (0,4%)	1 (0,9%)	0,542260
152	53 (22,3%)	15 (13,2%)	<b>0,041220</b>
154	8 (3,4%)	1 (0,9%)	0,282060
156	3 (1,3%)	1 (0,9%)	1,000000
158	9 (3,8%)	0	<b>0,036280</b>
160	1 (0,4%)	1 (0,9%)	0,543300
162	1 (0,4%)	0	1,000000

E: amostra de origem predominantemente européia; M: amostra de mestiços de origem européia e africana; n: frequência absoluta do alelo; (%): frequência relativa do alelo; N: número de indivíduos da amostra; *P*: valor de significância.

**Tabela 10.** Frequências alélicas absolutas e relativas do microsatélite *D6S510* e valor de *P* encontrado na comparação das duas amostras populacionais.

ALELOS (tamanho do fragmento em pares de base)	E (N=101) n (%)	M (N=43) n (%)	<i>P</i>
178	54 (26,7%)	22 (25,6%)	0,882000
186	27 (13,4%)	3 (3,5%)	<b>0,010200</b>
188	12 (5,9%)	6 (7,0%)	0,794140
190	17 (8,4%)	13 (15,1%)	0,097220
192	45 (22,3%)	15 (17,4%)	0,426120
194	7 (3,5%)	9 (10,5%)	<b>0,026580</b>
196	36 (17,8%)	18 (20,9%)	0,615920
198	2 (1,0%)	0	1,000000
200	1 (0,5%)	0	1,000000
202	1 (0,5%)	0	1,000000

E: amostra de origem predominantemente européia; M: amostra de mestiços de origem européia e africana; n: frequência absoluta do alelo; (%): frequência relativa do alelo; N: número de indivíduos da amostra; *P*: valor de significância.

Para o microssatélite *M2\_5\_11* foram encontrados 10 alelos, sendo que os mais freqüentes foram o 320 em E e o 288 em M (Tabela 11). Na comparação entre os dois extratos populacionais foi encontrado um valor de *P* próximo ao limiar ( $P=0,06944$ ) para o alelo 288 (Tabela 11) e a diferença foi significativa na comparação das distribuições alélicas ( $P=0,00704$ ). A heterozigosidade observada foi de 47,83% em E e 42,85% em M.

Para o microssatélite *DRACA1* foram encontrados 13 alelos, sendo que o mais freqüente foi o 244 nos dois extratos populacionais (Tabela 12). Não houve diferença significativa na freqüência de nenhum alelo (Tabela 12) e nem na distribuição alélica ( $P=0,5226$ ) entre as populações. A heterozigosidade observada foi de 84,81% em E e 82,61% em M.

Foi calculado o equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os locos. Os locos encontravam-se em equilíbrio com exceção de: *MICA* em M ( $P=0,01336$ ), *DRACA1* em M ( $P=0,03011$ ), *BAT2CA* em E ( $P=0,02904$ ) e *M2\_5\_11* (E:  $P=0,00000$ ; M:  $P=0,00000$ ). O desvio do equilíbrio em *MICA* (M) está concentrado nos genótipos 186/186, 185/186, 185/188 e 186/197 e nos demais microssatélites o desvio está distribuído por muitos genótipos.

As freqüências haplotípicas foram calculadas para os locos dois a dois e também para o conjunto total dos locos nos dois extratos populacionais. Na Tabela 13 o número de haplótipos encontrados é comparado com o número esperado em total aleatoriedade (calculado apenas pela multiplicação do número de alelos de cada loco). Pela observação das freqüências haplotípicas não foi possível detectar locos que pudessem estar em acentuado desequilíbrio de ligação. As freqüências haplotípicas mais altas se deviam à alta freqüência dos alelos que compunham o haplótipo.

**Tabela 11.** Frequências alélicas absolutas e relativas do microssatélite *M2\_5\_11* e valor de *P* encontrado na comparação das duas amostras populacionais.

ALELOS (tamanho do fragmento em pares de base)	E (N=115) n (%)	M (N=56) n (%)	<i>P</i>
285	0	2 (1,8%)	0,109160
287	14 (6,1%)	9 (8,0%)	0,493480
288	51 (22,2%)	36 (32,1%)	0,069440
289	10 (4,3%)	1 (0,9%)	0,107080
290	0	2 (1,8%)	0,107720
293	43 (19,1%)	13 (11,6%)	0,096220
315	19 (8,3%)	5 (4,5%)	0,257360
319	21 (9,1%)	16 (14,3%)	0,189220
320	69 (30,0%)	26 (23,2%)	0,189640
321	1 (0,4%)	2 (1,8%)	0,250280

E: amostra de origem predominantemente européia; M: amostra de mestiços de origem européia e africana; n: frequência absoluta do alelo; (%): frequência relativa do alelo; N: número de indivíduos da amostra; *P*: valor de significância.

**Tabela 12.** Frequências alélicas absolutas e relativas do microssatélite *DRACA1* e valor de *P* encontrado na comparação das duas amostras populacionais.

ALELOS (tamanho do fragmento em pares de base)	E (N=79) n (%)	M (N=46) n (%)	<i>P</i>
242	22 (13,9%)	10 (10,9%)	0,553500
244	31 (19,6%)	23 (25,0%)	0,342540
246	1 (0,6%)	0	1,000000
252	11 (7,0%)	8 (8,7%)	0,630420
253	7 (4,4%)	6 (6,5%)	0,555600
254	20 (12,7%)	10 (10,9%)	0,841320
255	9 (5,7%)	7 (7,6%)	0,599460
256	7 (4,4%)	3 (3,3%)	0,749200
257	7 (4,4%)	1 (1,1%)	0,268740
258	22 (13,9%)	16 (17,4%)	0,482520
260	1 (0,6%)	3 (3,3%)	0,141320
261	19 (12,0%)	5 (5,4%)	0,109460
263	1 (0,6%)	0	1,000000

E: amostra de origem predominantemente européia; M: amostra de mestiços de origem européia e africana; n: frequência absoluta do alelo; (%): frequência relativa do alelo; N: número de indivíduos da amostra; *P*: valor de significância.

**Tabela 13.** Número de haplótipos encontrados e número de haplótipos esperados em total aleatoriedade.

continua

Locos do haplótipo	E		M	
	Número observado de haplótipos	Número esperado de haplótipos	Número observado de haplótipos	Número esperado de haplótipos
<i>DRACA1/TNFD</i>	32	91	28	66
<i>BAT2CA/HLAC-CA1</i>	51	168	33	144
<i>DRACA1/HLAC-CA1</i>	46	156	40	132
<i>HLAC-CA1/M2_5_11</i>	47	96	43	120
<i>HLAC-CA1/TNFD</i>	39	84	32	72
<i>HLAC-CA1/MICA</i>	35	60	30	60
<i>M2_5_11/D6S510</i>	41	80	29	70
<i>BAT2CA/D6S2222</i>	38	112	27	108
<i>BAT2CA/M2_5_11</i>	48	112	33	120
<i>BAT2CA/MICA</i>	32	60	27	60
<i>BAT2CA/DRACA1</i>	49	182	38	132
<i>M2_5_11/D6S2222</i>	31	64	29	90
<i>D6S510/D6S2222</i>	32	80	21	63
<i>M2_5_11/DRACA1</i>	37	104	27	110
<i>M2_5_11/MICA</i>	28	40	28	50
<i>TNFD/D6S510</i>	32	70	19	42
<i>TNFD/D6S2222</i>	25	56	23	54
<i>M2_5_11/TNFD</i>	32	56	29	60

**Tabela 13.** Número de haplótipos encontrados e número de haplótipos esperados em total aleatoriedade.

Locos do haplótipo	conclusão			
	E		M	
	Número observado de haplótipos	Número esperado de haplótipos	Número observado de haplótipos	Número esperado de haplótipos
<i>BAT2CA/D6S510</i>	44	140	26	84
<i>MICA/D6S510</i>	32	50	23	35
<i>MICA/TNFD</i>	19	35	17	30
<i>MICA/D6S2222</i>	25	40	24	45
<i>HLAC-CA1/D6S2222</i>	37	96	30	108
<i>DRACA1/MICA</i>	36	65	28	55
<i>DRACA1/D6S2222</i>	33	104	29	99
<i>BTA2CA/TNFD</i>	36	98	25	72
<i>DRACA1/D6S510</i>	45	130	32	77
<i>HLAC-CA1/D6S510</i>	43	120	33	84
TODOS	96	48 921 600	51	29 937 600



## 5 DISCUSSÃO

A técnica utilizada para a tipagem dos microsatélites foi escolhida por apresentar uma maior precisão para diferenciar fragmentos com apenas dois pares de base de diferença se comparada com a corrida em gel de poliacrilamida em aparelho tradicional. Porém, apesar da precisão, existe ainda uma dificuldade quando se trata de fragmentos com apenas um par de base de diferença. Por isso, microsatélites com unidades de repetição de um par de base não são muito utilizados.

Neste trabalho, temos oito microsatélites dinucleotídeos, um trinucleotídeo e um pentanucleotídeo, mas encontramos em vários deles alelos que diferiam por apenas um par de base. Em muitos casos, estes alelos não eram esperados e pode ser que resultem de erros de tipagem. Estes erros podem ser corrigidos com a repetição da tipagem dos indivíduos portadores de tais alelos. Estes casos são: *D6S2222* (alelo 241), *HLAC-CA1* (alelos 100, 102 e 106), *BAT2CA* (alelos 139, 149 e 151) e *DRACA1* (alelos 253, 255, 257, 261 e 263). Se os alelos inesperados continuarem a aparecer mesmo com as repetições, outras abordagens serão adotadas. Isto é necessário pois existe a possibilidade destes alelos serem repetições imperfeitas dos microsatélites. As outras abordagens são: análise de segregação em família, pois com várias ou até mesmo uma única geração é possível confirmar a existência ou não desses alelos; seqüenciamento de algumas amostras, o que permitiria ver a seqüência exata de nucleotídeos, comprovando ou não a existência de repetições imperfeitas; e a análise de nova amostra de DNA dos mesmo indivíduos, pois os problemas podem estar aparecendo devido a impurezas na solução de DNA utilizada, que dificultariam a PCR.

O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg encontrado para *DRACA1* e *BAT2CA* pode ter ocorrido justamente pela presença destes alelos duvidosos, alterando a frequência dos alelos com um par de base de distância e forçando frequências genotípicas esperadas diferentes das observadas.

Em outros dois microssatélites apareceram também fragmentos que diferiram por apenas um par de base: *MICA* e *M2\_5\_11*. Porém, nestes casos a explicação é diferente. A descrição do marcador *M2\_5\_11* foi feita com base em um alelo que gerou um fragmento de PCR com 318 pb (MATSUZAKA *et al.*, 2000), que não foi encontrado neste trabalho. Na descrição, a faixa possível de tamanho de alelos era de 285 a 318 pb, sendo um marcador pentanucleotídeo, porém com repetições imperfeitas. Considerando apenas os alelos mais freqüentes deste trabalho teremos os seguintes tamanhos de fragmentos em pares de base: 288, 293, 319 e 320. O intervalo entre 288 pb e 293 pb é de cinco nucleotídeos, o que condiz com a repetição TTCTT do marcador. Já os tamanhos 319 pb e 320 pb estão bem próximos ao alelo descrito de 318 pb. Então, a maior parte dos alelos encontrados deve refletir pequenos erros pela dificuldade de definir alelos com um par de base de diferença. Porém, para entendermos os tamanhos de fragmentos encontrados, as mesmas medidas já citadas (repetições, análise de segregação em família, seqüenciamento e análise de amostras de DNA novas dos mesmos indivíduos) serão tomadas. Os outros resultados para este marcador podem ser justificados pela provável inexistência da maior parte dos alelos encontrados. A heterozigosidade encontrada foi baixa (47,83% em E e 42,85% em M), pois grande parte dos alelos teve freqüências baixíssimas e apenas quatro alelos (288, 293, 319 e 320) tiveram freqüências acima de 10%. Além disso, foi encontrado um desvio pronunciado do equilíbrio de Hardy-Weinberg, que pode ser devido a desvios de freqüências encontrados pela designação errada de alelos.

Já no caso do *MICA* era esperado que aparecesse um alelo com um par de base de diferença de outro. Na literatura, o microssatélite *MICA* é descrito como tendo cinco ou seis alelos: A4, A5, A5.1, A6, A9 e A10 (mais raro) sendo que os números se referem ao número de repetições (GCT)<sub>n</sub> e o alelo A5.1 tem cinco repetições e uma inserção de um nucleotídeo em uma repetição (GGCT). Estes alelos corresponderiam, respectivamente, aos seguintes tamanhos de fragmento em pares de base: 179, 182, 183, 185, 194 e 197 (MIZUKI *et al.*, 1997; PEREZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2000). Neste trabalho, alguns dos tamanhos de fragmentos dos 5 alelos encontrados (182, 185, 186, 188 e 197) referem-se a números de repetições nunca descritos, ou raríssimos (182, cinco repetições; 185, seis repetições; 186, seis repetições mais uma inserção; 188, sete repetições e 197, dez repetições). Este problema desaparece quando se considera cada alelo com 3 pb a menos,

com o que os alelos encontrados passam a coincidir com os descritos na literatura. Portanto, será adotada neste trabalho, para comparações com populações já estudadas, a nomenclatura utilizada na literatura considerando-se 3 pb a menos para cada alelo encontrado.

O marcador *MICA* parece variar muito de acordo com a população estudada. Foram encontradas diferenças entre os extratos populacionais estudados e estão mostradas na Tabela 14 frequências descritas em outras populações. Para o alelo A4, a frequência encontrada no extrato de origem mestiça foi a mais baixa até o momento. Isto talvez seja reflexo de uma baixa frequência deste alelo na população africana de origem. Porém, não há dados publicados para populações africanas. Já para o alelo A9, a frequência do extrato de origem predominantemente européia foi a mais alta. Esta alta frequência pode ser explicada por uma possível frequência elevada na população portuguesa, que foi a população européia que mais contribuiu para a formação da nossa população. Porém não há dados publicados para a população portuguesa. Além disso, este extrato populacional, ainda que sendo de origem predominantemente européia, é sabidamente miscigenado (BRAUN-PRADO *et al.*, 2000). Então, esta frequência elevada poderia resultar de uma alta frequência em africanos e/ou em indígenas. No geral, as frequências alélicas na nossa população são parecidas com as dos caucasóides dos EUA e dos chineses da etnia Uyгур. Nota-se que para este loco o padrão de distribuição das frequências alélicas não obedece uma regularidade em áreas geográficas, observando grandes variações em uma mesma população (Suécia). Essa distribuição pode estar relacionada com dificuldades de tipagem. Outra possível explicação diz respeito à localização deste microssatélite. O gene *MICA*, assim como este microssatélite, está muito próximo do gene HLA-B. Como os genes HLA apresentam variações entre populações, o desequilíbrio de ligação entre estes dois locos poderia estar levando a esta variação de frequências também no microssatélite. De qualquer maneira, esta grande variação encontrada evidencia a importância do estudo deste microssatélite.

**Tabela 14.** Frequências alélicas do microssatélite *MICA* em diversas populações.

Alelo	Tamanho do fragmento (pb)	Brasil (M) n=53 (%)	Brasil (E) n=106 (%)	Caucasianos dos EUA* (9) n=72 (%)	Espanha* (13) n=116 (%)	Itália (5) n= 26 (%)	Suécia* (10) n=229 (%)	Suécia* (12) n=120 (%)	Suécia* (14) n=153 (%)
A4	179	4,7	8,0	10,2	13,9	9,6	13,9	16,9	13,9
A5	182	16,0	14,1	14,2	15,1	21,2	13,4	17,5	33,6
A5.1	183	27,4	24,5	21,8	25,1	11,5	44,3	46,1	41,6
A6	185	32,1	21,7	30,2	24,5	40,4	15,1	5,1	4,6
A9	194	19,8	31,6	22,7	16,3	17,3	15,1	11,1	9,4

Alelo	Tamanho do fragmento (pb)	República Tcheca (8) n=140 (%)	Grécia (6) n=40 (%)	Grécia (5) n=27 (%)	Turquia (7) n=50 (%)	Palestina/Jordânia* (11) n=102 (%)	Arábia Saudita (5) n=18 (%)	Irã (5) n=18 (%)	Cazaquistão (5) n=38 (%)
A4	179	26,4	17,5	14,8	15,0	12,5	5,6	8,3	13,1
A5	182	20,0	10,0	11,1	16,0	15,9	8,3	16,7	23,7
A5.1	183	59,3	27,5	22,3	21,0	20,7	22,2	16,7	22,4
A6	185	30,7	28,8	40,7	33,0	34,3	50,0	47,2	22,4
A9	194	29,3	16,3	11,1	15,0	15,3	13,9	11,1	18,4

Alelo	Tamanho do fragmento (pb)	China (Han) (5) n=32 (%)	China (Hui) (5) n=44 (%)	China (Uygur) (5) n=49 (%)	Coréia (2) n=204 (%)	Coréia (3) n=297 (%)	Coréia (4) n=134 (%)	Japão (1) n=103 (%)	Japão (5) n=352 (%)
A4	179	9,4	9,1	7,1	13,0	14,8	15,3	17,0	16,1
A5	182	28,1	30,7	16,3	26,2	32,3	29,1	31,6	29,2
A5.1	183	26,6	23,9	22,5	19,1	15,0	16,0	9,2	12,3
A6	185	15,6	17,0	33,7	26,5	22,6	24,6	25,7	25,8
A9	194	20,3	19,3	20,4	15,2	15,3	14,9	16,5	16,6

(1) MIZUKI *et al.*, 1997; (2) PARK *et al.*, 2002a; (3) MOK *et al.*, 2003; (4) PARK *et al.*, 2001; (5) OTA *et al.*, 1997; (6) YABUKI *et al.*, 1999; (7) YIGITBAS *et al.*, 2003; (8) NOVOTA *et al.*, 2004; (9) PARK *et al.*, 2002b; (10) HASSAN *et al.*, 2003; (11) WALLACE *et al.*, 1999; (12) GHADERI *et al.*, 2001; (13) FDEZ-MORERA *et al.*, 2003; (14) GHADERI *et al.*, 1999. \* frequência alélica calculada a partir da fenotípica fornecida.

O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg encontrado para *MICA* deve estar relacionado com a dificuldade de se diferenciar alelos com apenas um par de base de diferença. Ou seja, o alelo 185 pode ter sido designado algumas vezes como 186 e vice-versa. Foi perceptível que a frequência do genótipo homozigoto 186/186 e do genótipo 185/186 está aumentada, sendo que em alguns destes casos o genótipo real deve ser 185/185. A frequência do alelo 186, portanto, deve estar aumentada, fazendo com que a frequência esperada dos genótipos com o alelo 186 estejam elevadas e as dos genótipos com 185 estejam reduzidas. Para se ter certeza da tipagem dos indivíduos portadores destes alelos serão adotadas as mesmas medidas já citadas acima.

O microsatélite *MICA* se encontra dentro do éxon 5 do gene *MICA*, na região que codifica para a porção transmembrânica da proteína. As unidades de repetição correspondem a alaninas na proteína e o alelo 5.1, que tem uma inserção, causa uma mudança na matriz de leitura, levando a uma interrupção prematura da proteína pela presença do códon de terminação TAA (MIZUKI *et al.*, 1997). A ausência de outros alelos (como sete ou oito repetições) nas populações estudadas até o momento indica que estes devem ser deletérios, codificando uma proteína incapaz de exercer uma função vital (OTA *et al.*, 1997). Estes fatos nos dão maior segurança para admitir que os alelos encontrados neste trabalho sejam equivalentes aos descritos na literatura, como mencionado anteriormente. Além disso, a ausência dos mesmos alelos na nossa população reforça esta hipótese.

Não foram encontrados dados de frequências alélicas em outras populações para os demais marcadores, com exceção de *TNFD*. Porém, mesmo para este marcador, não será possível uma extensa comparação, já que na literatura, muitos artigos trazem os alelos nomeados por d1, d2, d3, d4, d5, d6, d7 e d8 e não foi encontrada a equivalência destes nomes em tamanhos do fragmento em pares de base. A única comparação possível foi com uma população alemã (Tabela 15).

**Tabela 15.** Frequências de indivíduos portadores das variantes do microsatélite *TNFd*.

ALELOS (tamanho do fragmento em pb)	Brasileiros (E) n=127 (%)	Brasileiros (M) n=57 (%)	Alemães (1) n=135 (%)
126	11,8	10,5	16,3
128	2,4	10,5	3,0
130	73,2	75,4	68,1
132	50,4	38,6	51,9
134	23,6	29,8	15,6
136	3,1	3,5	5,2
138	0,8	0	0
140	0	0	0,7

E: amostra de origem predominantemente européia; M: amostra de origem mestiça de africanos e europeus; (1) FEICHTLBAUER *et al.*, 1998.

O extrato populacional E foi bem semelhante aos alemães, com exceção do alelo 134. Este alelo pode ser mais freqüente nos portugueses, que foram os principais colonizadores do Brasil. Já para M, em comparação com os alemães, diferiram em freqüência os alelos 128, 130, 132 e 134. A diferença encontrada para todos, com exceção do 134, pode ser justificada pela origem africana, sendo que a freqüência do alelo 128 já havia diferido do extrato de origem predominantemente européia. Os alelos 128 e 130 devem ser mais freqüentes em populações africanas, já o alelo 132 deve ter sua freqüência diminuída nestas populações em comparação com europeus. A diferença encontrada entre M e alemães para o alelo 134 deve ter a mesma origem da diferença encontrada entre E e alemães.

A heterozigosidade variou bastante de loco para loco neste estudo, sendo que para *TNFD*, *MICA* e *HLAC-CA1* foi mais alta em M e para *D6S2222*, *BAT2CA*, *D6S510*, *M2\_5\_11* e *DRACA1* foi mais alta em E. Porém, nem sempre a diferença entre os dois extratos foi grande, sendo que as maiores diferenças foram para *D6S2222* e *HLAC-CA1* (Tabela 16). Para *D6S2222* a heterozigosidade foi mais alta em E e neste marcador M tem apenas dois alelos com freqüência acima de 10%, enquanto E tem três (Tabela 6). Isso mostra que, provavelmente, existe um menor número de alelos, ou a maior parte dos alelos são raros nos ancestrais africanos e nos ancestrais europeus a diversidade é maior. Já para o *HLAC-CA1*, a heterozigosidade é maior em M. Neste caso, a maior diversidade deve estar na população ancestral africana. A heterozigosidade média foi similar nos dois extratos populacionais, mostrando que, para estes marcadores, não há uma tendência geral de maior diversidade. Deve-se levar em consideração o fato da amostra populacional M ter um menor número de indivíduos, o que poderia estar reduzindo a ocorrência de alelos raros. É possível que, se ambos os extratos tivessem um número próximo de indivíduos, as heterozigosidades mais altas fossem encontradas em M. Isto porque M é uma população mestiça de origem africana e européia e, se estas duas populações de origem tiverem freqüências alélicas diferentes, a freqüência em M será intermediária, resultando em uma maior diversidade.

**Tabela 16.** Heterozigosidades observadas nos dois extratos populacionais estudados.

Marcador Microssatélite	Heterozigosidade em E	Heterozigosidade em M
<i>TNFd</i>	65,3%	68,4%
<i>D6S2222</i>	65,2%	53,6%
<i>MICA</i>	70,7%	73,6%
<i>HLAC-CA1</i>	77,6%	84,7%
<i>BAT2CA</i>	89,1%	84,2%
<i>D6S510</i>	82,2%	81,4%
<i>M2_5_11</i>	47,8%	42,8%
<i>DRACA1</i>	84,8%	82,6%
Heterozigosidade média	72,8%	71,4%

E: amostra de origem predominantemente européia; M: amostra de origem mestiça de africanos e europeus.



As frequências haplotípicas encontradas não mostraram uma evidência de acentuado desequilíbrio de ligação entre os locos. Porém, quando comparamos o número de haplótipos encontrados com o número esperado em aleatoriedade, fica nítido o pequeno número de haplótipos observados (Tabela 13). O número esperado foi calculado pela multiplicação do número de alelos de cada loco, não podendo ser observado um número igual em amostras pequenas como as estudadas. Isto porque haplótipos raros dificilmente seriam amostrados e alelos que apareceram em apenas um indivíduo não poderiam aparecer em combinação com todos os alelos de outro loco. Porém, a diferença encontrada foi grande e parece indicar a existência de desequilíbrio de ligação. O cálculo de desequilíbrio de ligação será feito para verificar esta suposição.

## 6 CONCLUSÃO

Para os microssatélites *TNFD* e *D6S510* a análise da população foi concluída, não sendo necessárias futuras análises para confirmação de resultados. Será necessário, porém, entender a relação da nomenclatura utilizada para alelos de *TNFD* (d1, d2, d3, d4, d5, d6, d7 e d8) com os fragmentos encontrados, para possibilitar a utilização da nomenclatura encontrada na literatura. O fato de não terem sido encontrados dados de frequências para *D6S510* mostra que este marcador deve ter sido pouco estudado até o momento, o que reforça a importância do seu estudo em populações.

Para o microssatélite *MICA* as tipagens não apresentaram problemas. Porém, a correspondência com alelos já descritos só foi possível quando se consideravam os fragmentos encontrados com 3 pb a menos. Testes posteriores deverão ser feitos para esclarecer a causa desta discrepância. Apesar disso, foi admitida a correspondência para permitir comparações com estudos anteriores. Nas comparações ficou evidente que as frequências alélicas desse marcador variam muito de estudo para estudo, mesmo que se trate de populações próximas geograficamente. Portanto, este marcador parece não caracterizar grandes áreas geográficas. De qualquer forma, ficou evidente a importância do estudo deste marcador em populações, devido ao seu polimorfismo e a ocorrência de variações de frequências entre populações.

Para os demais microssatélites, análises adicionais terão que ser feitas, para que a caracterização das populações estudadas seja finalizada. Não foram encontrados dados de frequência para estes locos em outras populações, o que mostra que estes marcadores não devem ter sido muito estudados até o momento. Talvez a escassez de dados seja reflexo de dificuldades de tipagem encontradas sempre para esses marcadores.

## 7 REFERÊNCIAS

AJIOKA, R.S.; JORDE, L.B.; GRUEN, J.R.; YU, P.; DIMITROVA, D.; BARROW, J.; RADISKY, E.; EDWARDS, C.Q.; GRIFFEN, L.M.; KUSHNER, J.P. Haplotype analysis of hemochromatosis: evaluation of different linkage-disequilibrium approaches and evolution of disease chromosomes. **Am. J. Hum. Genet.**, 60, p. 1439-1447, 1997.

BRAUN-PRADO, K.; MION, A.L.U.; PEREIRA, N.F.; CULPI, L.; PETZL-ERLER, M.L. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, 55, p. 417-427, 2000.

CAVALLI-SFORZA, L.L. **Genes, Povos e Línguas**. São Paulo: Companhia das Letras, 2003.

CAVET, J.; MIDDLETON, P.G.; SEGALL, M.; NOREEN, H.; DAVIES, S.M.; DICKINSON, A.M. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. **Blood**, 94, p. 3941-3946, 1999.

FDEZ-MORERA, J.L.; RODRIGO, L.; LÓPEZ-VÁZQUEZ, A.; RODERO, S.R.; MARTÍNEZ-BORRA, J.; NIÑO, P.; GONZÁLEZ, S.; LÓPEZ-LARREA, C. MHC class I Chain-related gene A transmembrane polymorphism modulates the extension of ulcerative colitis. **Hum. Immunol.**, 64, p. 816-822, 2003.

FEICHTLBAUER, P.; GOMOLKA, M.; BRUNNLER, G.; EISENHUT, T.; TRUCKENBRODT, H.; ALBERT, E.D. HLA region microsatellite polymorphisms in juvenile arthritis. **Tissue Antigens**, 52, p. 220-229, 1998.

FENG, M.; ZHANG, J.; XIE, J.; JI, Y.; LU, Q.; CHEN, L.; YANG, J.; GUO, X. The polymorphism distributions of MICA and MICB microsatellite in Guangdong Han population. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan**, 21, p. 294-296, 2004.

FOISSAC, A.; CROUAU-ROY, B.; FAURÈ, S.; THOMSEN, M.; CAMBON-THOMSEN, A. Microsatellites in the HLA region: an overview. **Tissue Antigens**, 49, p. 197-214, 1997.

GANDON, G.; JOUANOLLE, A.M.; CHAUVEL, B.; MAUVIEUX, V.; Le TREUT, A.; FEINGOLD, J.; Le GALL, J.Y.; DAVID, V.; YAOUANQ, J. Linkage disequilibrium and extended haplotypes in the HLA-A to D6S105 region: implications for mapping the hemochromatosis gene (HFE). **Hum. Genet.**, 97, p. 103-113, 1996.

GHADERI, M.; HJELMSTROM, P.; HALLMANS, G.; WIKLUND, F.; LENNER, P.; DILLNER, J.; SANJEEVI, C.B. MICA gene polymorphism and the risk to develop cervical intraepithelial neoplasia. **Hum. Immunol.**, 60, p. 970-973, 1999.

GHADERI, M.; ZAKE, L.N.; WALLIN, K.; WIKDUND, F.; HALLMANS, G.; LENNER, P.; DILLNER, J.; SANJEEVI, C.B. Tumor necrosis factor A and MHC class I chain related gene A (MIC-A) polymorphisms in Swedish patients with cervical cancer. **Hum. Immunol.**, 62, p. 1153-1158, 2001.

GRUBIC, Z.; PERIC, P.; EEEUK-JELICIC, E.; ZUNEC, R.; STINGL, K.; CURKOVIC, B.; KERHIN-BRKLJIC, V. The MICA-A4 triplet repeats polymorphism in the transmembrane region confers additional risk for development of psoriatic arthritis in the Croatian population. **Eur. J. Immunogenet.**, 31, p. 93-98, 2004.

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, 48, p. 361-372, 1992.

HASSAN, A.B.; NIKITINA-ZAKE, L.; PADYUKOV, L.; KARLSSON, G.; GUPTA, M.; LUNDBERG, I.E.; SANJEEVI, C.B. MICA4/HLA-DRB1\*04/TNF1 haplotype is associated with mixed connective tissue disease in Swedish patients. **Hum. Immunol.**, 64, p. 290-296, 2003.

HLA Class I and II DNA-Based Typing, Sequence specific Oligonucleotide Probe Typing, Technical Manual/ Reference Protocols. **13º Internacional Histocompatibility Workshop**, version 1.1, 2000.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico 2000**. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Censos/Censo\\_Demografico\\_2000/populacao/Grandes\\_Regioes/](ftp://ftp.ibge.gov.br/Censos/Censo_Demografico_2000/populacao/Grandes_Regioes/). Acesso em: 13 de junho de 2004.

**IMGT/HLA Sequence Database.** Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/index.html>. Acesso em: 20 de junho de 2004.

JANEWAY, C.; TRAVERS, P. **Imunobiologia**. O Sistema Imune na Saúde e na Doença. 8. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

KARELL, K.; KLINGER, N.; HOLOPAINEN, P.; LEVO, A.; PARTANEN, J. Major histocompatibility complex (MHC)-linked microsatellite markers in a founder population. **Tissue Antigens**, 56, p. 45-51, 2000.

KIM, H.K.; HAN, H.; CHOI, H.B.; PYO, C.W.; KIM, C.C.; KIM, T.G. Distribution of seven polymorphic markers and haplotypes within the human TNF gene cluster in Koreans. **Hum. Immunol.**, 61, p. 1274-1280, 2000.

KIRK, C.W.; DROOGAN, A.G.; HAWKINS, S.A.; McMILLAN, S.A.; NEVIN, N.C.; GRAHAM, C.A. Tumour necrosis factor microsatellites show association with multiple sclerosis. **J. Neurol. Sci.**, 147, p. 21-25, 1997.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.I. Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acid Res.**, 19, p. 5444, 1991.

LI, S.; KAWATA, H.; KATSUYAMA, Y.; OTA, M.; MORISHIMA Y.; MANO, S.; KULSKI, J.K.; NARUSE, T.; INOKO, H. Association of polymorphic MHC microsatellites with GVHD, survival, and leukemia relapse in unrelated hematopoietic stem cell transplant donor/recipient pairs matched at five HLA loci. **Tissue Antigens**, 63, p. 362-368, 2004.

LIN, L.; JIN, L.; KIMURA, A.; CARRINGTON, M.; MIGNOT, E. DQ microsatellite association studies in three ethnic groups. **Tissue Antigens**, 50, p. 507-520, 1997.

MAINOU-FOWLER, T.; DICKINSON, A.M.; TAYLOR, P.R.; MOUNTER, P.; JACK, F.; PROCTOR, S.J.; NORDON, J.; MIDDLETON, P.G. Tumour necrosis factor gene polymorphisms in lymphoproliferative disease. **Leuk. Lymphoma**, 38, p. 547-552, 2000.

MARTINEZ, A.; SALIDO, M.; BONILLA, G.; PASCUAL-SALCEDO, D.; FERNANDEZ-ARQUERO, M.; de MIGUEL, S.; Balsa, A.; de la CONCHA, E.G.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, B. Association of the major histocompatibility complex with response to infliximab therapy in rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Rheum.**, 50, p. 1077-1082, 2004.

MATSUZAKA, Y.; MAKINO, S.; TOMIZAWA, M.; OKA, A.; KIMURA, M.; BAHAM, S.; TAMIYA, G.; INOKO, H. New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class II region. **Tissue Antigens**, 56, p. 492-500, 2000.

MEYER, D.; THOMSON, G. How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. **Ann. Hum. Genet.**, 65, p. 1-26, 2001.

MIGNOT, E.; KIMURA, A.; LATTERMANN, A.; LIN, X.; YASUNAGA, S.; MUELLER-ECKHARDT, G.; RATAZZI, C.; LIN, L.; GUILLEMINAULT, C.; GRUMET, F.C.; MAYER, G.; DEMENT, W.C.; UNDERHILL, P. Extensive HLA class II studies in 58 non-DRB1\*15 (DR2) narcoleptic patients with cataplexy. **Tissue Antigens**, 49, p. 329-341, 1997.

MILLER, M.P. RXC: a program for the analysis of contingency tables via the metropolis algorithm computer. **Department of Biological Sciences**, Northern Arizona University, Flagstaff, 1997.

MIZUKI, N.; OTA, M.; KIMURA, M.; OHNO, S.; ANDO, H.; KATSUYAMA, Y.; YAMAZAKI, M.; WATANABE, K.; GOTO, K.; NAKAMURA, S.; BAHAM, S.; INOKO, H. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behçet's disease. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 94, p. 1298-1303, 1997.

MOK, J.W.; LEE, Y.J.; KIM, J.Y.; LEE, E.B.; SONG, Y.W.; PARK, M.H.; PARK, K.S. Association of MICA polymorphism with rheumatoid arthritis patients in Koreans. **Hum. Immunol.**, 64, p. 1190-1194, 2003.

NOVOTA, P.; KOLESAR, L.; SLAVCEV, A.; CERNA, M. Fluorescence-based automated fragment analysis of microsatellite polymorphism within the transmembrane region of the MIC-A gene. **Folia. Biol.**, 50, p. 21-23, 2004.

OTA, M.; KATSUYAMA, Y.; MIZUKI, N.; AND, H.; FURIHATA, K.; ONO, S.; PIVETTI-PEZZI, P.; TABBARA, K.F.; PALIMERIS, G.D.; NIKBIN, B.; DAVATCHI, F.; CHAMS, H.; GENG, Z.; BAHRAM, S.; INOKO, H. Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. **Tissue Antigens**, 49, p. 448-454, 1997.

PARK, S.H.; PARK, K.S.; SEO, Y.I.; MIN, D.J.; KIM, W.U.; KIM, T.G.; CHO, C.S.; MOK, J.W.; PARK, K.S.; KIM, H.Y. Association of MICA polymorphism with HLA-B51 and disease severity in Korean patients with Behcet's disease. **J. Korean Med. Sci.**, 17, p. 366-370, 2002a.

PARK, Y.; LEE, H.; SANJEEVI, C.B.; EISENBARTH, G.S. MICA polymorphism is associated with type 1 diabetes in the Korean population. **Diabetes Care**, 24, p. 33-38, 2001.

PARK, Y.S.; SANJEEVI, C.B.; ROBLES, D.; YU, L.; REWERS, M.; GOTTLIEB, P.A.; FAIN, P.; EISENBARTH, G.S. Additional association of intra-MHC genes, MICA and D6S273, with Addison's disease. **Tissue Antigens**, 60, p. 155-163, 2002b.

PEREZ-RODRIGUEZ, M.; CORELL, A.; ARGÜELLO, J.R.; COX, S.T.; MCWHINNIE, A.; MARSH, S.G.E.; MADRIGAL, J.A. A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite. **Tissue Antigens**, 55, p. 162-165, 2000.

PETZL-ERLER, M.L. Genetics of the immune responses and disease susceptibility. **Ciência e Cultura**, Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, 51, p. 199-211, 1999.

PRATIWI, R.; FLETCHER, L.M.; PYPER, W.R.; DO, K.A.; CRAWFORD, D.H.; POWELL, L.W.; JAWINSKA, E.C. Linkage disequilibrium analysis in Australian haemochromatosis patients indicates bipartite association with clinical expression. **J. Hepatol.**, 31, p. 39-46, 1999.

PROBST, C.M. **CONVERT**: uma ferramenta computacional auxiliar no estudo de polimorfismos genéticos e genética de populações. Programa distribuído pelo autor. Curitiba, 1998.

PYO, C.W.; HUR, S.S.; KIM, Y.K.; CHOI, H.B.; KIM, T.Y.; KIM T.G. Distribution of MICA alleles and haplotypes associated with HLA in the Korean population. **Hum. Immunol.**, 64, p. 378-384, 2003a.

PYO, C.W.; HUR, S.S.; KIM, Y.K.; CHOI, H.B.; HONG, Y.S.; KIM, D.W.; KIM, C.C.; KIM, H.K.; KIM, T.G. Polymorphisms of IL-1B, IL-1RN, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IFN- $\gamma$  genes in the Korean population. **Hum. Immunol.**, 64, p. 979-989, 2003b.

RUBIO, J.P.; BAHLO, M.; BUTZKUEVEN, H.; van Der MEI, I.A.; SALE, M.M.; DICKINSON, J.L.; GROOM, P.; JOHNSON, L.J.; SIMMONS, R.D.; TAIT, B.; VARNEY, M.; TAYLOR, B.; DWYER, T.; WILLIAMSON, R.; GOUGH, N.M.; KILPATRICK, T.J.; SPEED, T.P.; FOOTE, S.J. Genetic dissection of the human leukocyte antigen region by use of haplotypes of Tasmanians with multiple sclerosis. **Am. J. Hum. Genet.**, 70, p. 1125-1137, 2002.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin v. 2.000**: a software for population genetic data analysis. Genebra: Genetics and Biometry Laboratory, Dept. of Antropology, University of Genebra, 2000.

SLOMOV, E.; LOEWNTHAL, R.; GOLDBERG, I.; KOROSTISHEVSKY, M.; BRENNER, S.; GAZIT, E. Pemphigus Vulgaris in Jewish patients is associated with HLA-A region genes: mapping by microsatellite markers. **Hum. Immunol.**, 64, p. 771-779, 2003.

THE MHC SEQUENCING CONSORTION. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. **Nature**, 401, p. 921-923, 1999.

THOMAS, W.; FULLAN, A.; LOEB, D.B.; McCLELLAND, E.E.; BACON, B.R.; WOLFF, R.K. A haplotype and linkage disequilibrium analysis of the hereditary hemochromatosis gene region. **Hum. Genet.**, 102, p. 517-525, 1998.

TSUJIMURA, A.; OTA, M.; KATSUYAMA, Y.; SADA, M.; MIURA, H.; MATSUMIYA, K.; GOTOH, R.; NAKATANI, T.; OKUYAMA, A.; TAKAHARA, S. Susceptibility gene for non-obstructive azoospermia located near HLA-DR and -DQ loci in the HLA class II region. **Hum. Genet.**, 110, p. 192-197, 2002.

TSUNETO, L.T.; PROBST, C.M.; HUTZ, M.H.; SALZANO, F.M.; RODRIGUEZ-DELFIN, L.A.; ZAGO, M.A.; HILL, K.; HURTADO, A.M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.C.; PETZL-ERLER, M.L. HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Aché. **Tissue Antigens**, 62, p. 512-526, 2003.

TUGLULAR, S.; BERTHOUX, P.; BERTHOUX, F. Polymorphisms of the tumour necrosis factor alpha gene at position -308 and TNFd microsatellite in primary IgA nephropathy. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 18, p. 724-731, 2003.

WALLACE, G.R.; VERITY, D.H.; DELAMAINE, L.J.; OHNO, S.; INOKO, H.; OTA, M.; MIZUKI, M.; YABUKI, K.; KONDIATIS, E.; STEPHENS, H.A.; MADANAT, W.; KANAWATI, C.A.; STANFORD, M.R.; VAUGHAN, R.W. MIC-A allele profiles and HLA class I associations in Behcet's disease. **Immunogenetics**, 49, p. 613-617, 1999.

WEG-REMERS, S.; BRENDEN, M.; SCHWARZ, E.; WITZEL, K.; SCHNEIDER, P.M.; GUERRA, L.K.; REHFELDT, I.R.; LIMA, M.T.; HARTMANN, D.; PETZL-ERLER, M.L.; de MESSIAS, I.J.; MAUFF, G. Major histocompatibility complex (MHC) class III genetics in two Amerindian tribes from Southern Brazil: the Kaingang and the Guarani. **Human Genetics**, 100, p. 548-556, 1997.

YABUKI, K.; MIZUKI, N.; OTA, M.; KATSUYAMA, Y.; PALIMERIS, G.; STAVROPOULOS, C.; KOUMANTAKI, Y.; SPYROPOULOU, M.; GIZIAKI, E.; KAKLAMANI, V.; KAKLAMANI, E.; INOKO, H.; OHNO, S. Association of MICA gene and HLA-B\*5101 with Behcet's disease in Greece. **Invest. Ophthalmol.**, 40, p. 1921-1926, 1999.

YIGITBAS, E.; DING, W.Z.; UNER, A.; GUC, D.; TATAYOGLU, G.; KANSU, E.; FRASER, P.A. MICA exon 5 microsatellite alleles in a healthy Turkish population. **Hum. Immunol.**, 64, p. S175, 2003.

YU, H.X.; REN, E.C.; CHAN, S.H. Associations of HLA microsatellites with rheumatoid arthritis in Singaporean Chinese. **Tissue Antigens**, 62, p. 133-138, 2003.

YU, H.X.; THAI, A.C.; CHAN, S.H. HLA microsatellite associations with insulin-dependent diabetes mellitus in Singaporean Chinese. **Hum. Immunol.**, 60, p. 894-900, 1999.